

蚕蛹甲壳素的脱色方法与机理探讨

李端华* 周小华

(重庆大学化学化工学院 重庆 400044)

摘要 研究了从粗甲壳素(分离蚕蛹蛋白质后的残渣)中提取蚕蛹甲壳素的工艺条件,探索了 H_2O_2 氧化脱色方法。实验结果表明,在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴中,按照 $m(\text{蚕蛹渣})/m(5\% \text{ 氢氧化钠})=3080$ 的质量比处理 2 h,可脱净残余蛋白,得到黑褐色的粗蚕蛹甲壳素。用 H_2O_2 脱色漂白,工艺条件为: $65\sim 70\text{ }^\circ\text{C}$, pH 值为 8.5 ± 0.5 , 时间 5 h, $m(\text{蚕蛹渣})/m(30\% H_2O_2)=50/30$ 。所得甲壳素白度为 30%, 收率为 25%。双氧水脱除蚕蛹甲壳素颜色的机理可能是 H_2O_2 分解的 $O_2^{\cdot -}$ 作用于铁硫蛋白与细胞色素复合物体系中的硫,将体系中半胱氨酸硫氧化成亚砷,使得色蛋白与甲壳素相连的键断开,从而使色素从甲壳素上分离下来。

关键词 甲壳素, 蚕蛹, 双氧水, 脱色

中图分类号: O636

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2004)03-0309-04

我国是世界上最主要的蚕丝生产和出口国。目前,国内蚕蛹的综合利用主要包括综合提取蛹油、蛹蛋白、蛹甲壳素和综合提取蛹油与制备复合氨基酸两大方面^[1]。生产蚕蛹分离蛋白时产生 10% 左右残渣,其中,甲壳素含量高达 36%,比虾蟹壳中的含量还高^[2]。因此,制备蛹壳聚糖具有较高的经济价值。

甲壳素(chitin)是由 2-乙酰氨基-2-脱氧- β -D-葡萄糖通过 β -(1,4)糖苷键连接起来的直链多糖。甲壳素及其衍生物的应用领域很广,涉及化工、纺织、印染、造纸、饲料、烟草、化妆、污水处理等各方面。

蚕蛹甲壳素的颜色很深,严重地影响其应用范围。目前,甲壳素的漂白多数是采用高锰酸钾法进行氧化脱色^[3,4],但其脱色液却难以处理,需用亚硫酸钠还原,成本较高。双氧水是工业上常用的氧化脱色剂,价格低且分解产物无污染。本文从制备蚕蛹分离蛋白后的残渣中提取蚕蛹甲壳素,研究了用 H_2O_2 进行氧化脱色处理的方法和工艺条件,分析了 H_2O_2 的漂白作用机制。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Quanx X 射线荧光能谱仪(美国热电集团); LD4-2 低速离心机; 752C 型分光光度计; 180-80 原子吸收分光光度计(日本日立公司); ET2000 型阴离子色谱(北京梨园公司); 550 II 型红外光谱仪(美国 Nicolet 公司), YQ-Z-W180 型白度计,用标准白色光源照射样品,经积分球混合,经多块滤光片测出光强度而计算出白度。

蚕蛹脱蛋白质残渣(重庆年年生物制品公司提供),其它试剂均为化学纯。

1.2 蚕蛹甲壳素的制备

称取 50 g 黑褐色蚕蛹脱蛋白质残渣于烧杯中,研碎后加入 300 mL 5% 的 NaOH,薄膜密封, $(70\pm 5)\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中处理 5 h。抽滤,残渣用纯净水洗至中性或弱碱性时止。此滤渣为粗甲壳素,烘干备用。

将粗甲壳素置于烧杯中,加入 400 mL 3% 的 HCl 溶液,室温下处理 3 h 以上,以脱除无机盐。滤去脱盐液,将滤渣置于 pH 值为 4.50~5.50 的溶液中,加入 200 mL 1% 的 $KMnO_4$ 溶液,室温下氧化 1 h 后抽滤。向残渣中加入 200 mL 2% 的 Na_2SO_3 溶液,以还原 Mn^{7+} ,此时体系的 pH=9.0。放置 40 min 后,调节悬浊液 pH 值至 5~6,即可见有部分悬浮物变成浅黄色。抽滤,将脱色残渣洗涤至中性, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烘干。产物为 $KMnO_4$ 脱色甲壳素。蚕蛹蛋白质多为球蛋白,可溶解于稀碱液中,因此,一般用稀 NaOH 提取^[5]。取定量蚕蛹脱蛋白质残渣 30 g,置于烧杯中,分别加入不同量的质量分数为 5% 的 NaOH 溶液处理

2 h, 抽滤, 滤渣用纯净水洗至呈中性时止。滤渣各用 160 mL 体积分数为 3% 的 HCl 溶液脱 Ca^{2+} 3 h 后抽滤, 滤渣用纯净水洗至呈中性时止。产物为脱 Ca^{2+} 蚕蛹甲壳素。

2 结果与讨论

2.1 不同氧化剂脱色效果比较

分别取定量 KMnO_4 脱色甲壳素, 按表 1 加入氧化剂进行脱色处理, 其中 $V(1\% \text{KMnO}_4) V(2\% \text{Na}_2\text{SO}_3) V(30\% \text{H}_2\text{O}_2) V(\text{CH}_3\text{COOOH}) = 22\text{F}$; 反应 5 h 后抽滤, 滤渣用纯净水洗至呈中性时止。各处理的脱色效果见表 1。

表 1 不同氧化剂与蚕蛹甲壳素脱色效果的关系

Table 1 The relationship between the oxidizers and the decolorization of chrysalis chitin

Oxidizer	$t/^\circ\text{C}$	Whiteness/ %
$V(\text{KMnO}_4) V(\text{Na}_2\text{SO}_3) = 1\text{F}$	65 ~ 70	4.60
$V(\text{KMnO}_4) V(\text{Na}_2\text{SO}_3) V(\text{H}_2\text{O}_2) = 22\text{F}$	65 ~ 70	7.40
$V(\text{KMnO}_4) V(\text{Na}_2\text{SO}_3) V(\text{CH}_3\text{COOOH}) = 22\text{F}$	65 ~ 70	26.80
H_2O_2	65 ~ 70	18.10
CH_3COOOH	65 ~ 70	22.00

可见, 在 65 ~ 70 $^\circ\text{C}$ 条件下用 KMnO_4 脱色蚕蛹甲壳素效果不佳。单独用 CH_3COOOH 或 H_2O_2 处理蚕蛹甲壳素, 其效果远超过 KMnO_4 处理及其与 H_2O_2 的组合。

提取蚕蛹分离蛋白时, 采用 85 $^\circ\text{C}$ 的 1% NaOH 溶液^[5], 稀碱可能仅仅使蛋白质的肽链发生部分水解, 并未完全切除蛋白质与 *N*-乙酰葡萄糖胺的化学结合, 致使蚕蛹甲壳素上仍残留部分小分子肽段交联物, 形成一定的空间位阻。虽然 KMnO_4 氧化能力强, 但是 MnO_4^- 体积较大, 进入困难, 因此脱色效果差; H_2O_2 和 CH_3COOOH 都是以 O_2^{2-} 形式起作用, 由于在酸性条件下 H_2O_2 的氧化能力比在碱性条件下强, 所以过氧乙酸(按 $V(\text{乙酸}) V(\text{乙酸酐}) V(30\% \text{H}_2\text{O}_2) = 145$ 的比例制得)脱色的效果比单纯 H_2O_2 为好。但 CH_3COOOH 价格较高, 分解时产生浓烈的乙酸气味, 污染水及空气; 而 H_2O_2 价格低廉, 分解后的产物是水, 所以本文采用双氧水作为脱色剂。

2.2 NaOH 对蚕蛹甲壳素脱色的影响

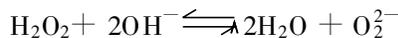
将 30 g 脱 Ca^{2+} 蚕蛹甲壳素各用 200 mL 纯净水分散, 用 5% NaOH 溶液调节 $\text{pH} = 9.0$, 在 60 $^\circ\text{C}$ 下分次加入 H_2O_2 (每次 5 mL), 观察甲壳素的颜色变化, 直至其呈白色为止。其结果见表 2。

表 2 NaOH 量与甲壳素脱色的关系

Table 2 The relationship between the amount of NaOH and the decolorization of chitin

$V(\text{NaOH})/\text{mL}$	$V(30\% \text{H}_2\text{O}_2)/\text{mL}$	Whiteness/ %	$V(\text{NaOH})/\text{mL}$	$V(30\% \text{H}_2\text{O}_2)/\text{mL}$	Whiteness/ %
160	65	24.2	60	85	22.3
100	70	25.1	40	85	23.0
80	65	24.5	0	120	11.3

可以看出, 若不用 NaOH 处理脱 Ca^{2+} 滤渣, 即使加入 120 mL H_2O_2 , 其脱色效果也差; 但是, 当 NaOH 液用量超过 40 mL 后, 再增加其用量收效甚微。稀 NaOH 既可溶解部分残留蛋白质, 同时也使脱色液的 pH 值维持在碱性。在此条件下, H_2O_2 分解产生 HOO^- 进行脱色; 在 NaOH 与 H_2O_2 之间存在下列关系:



因此, 当 H_2O_2 量确定后, 脱色所需的 NaOH 量也被确定。超过此限度, 即使再增加 NaOH 量, 也不能改善蚕蛹甲壳素的白度。

2.3 温度和 pH 值对蚕蛹甲壳素脱色的影响

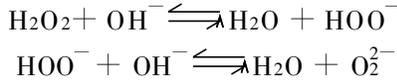
脱蛋白、脱 Ca^{2+} 粗甲壳素在不同温度和 pH 值下进行处理后的脱色效果列于表 3。由表中可见, 在碱性条件下, 温度显著影响 H_2O_2 对蚕蛹甲壳素的脱色效果。在 18 $^\circ\text{C}$ 或 25 $^\circ\text{C}$ 时, H_2O_2 分解速度非常慢; 而在 60 $^\circ\text{C}$ 以上时, H_2O_2 分解速度极快, 有大量气体产生。当脱色温度为 65 $^\circ\text{C}$ 时, 处理 5 h, 甲壳素的白

表 3 温度、pH 值对蚕蛹甲壳素脱色的影响

Table 3 The effect of temperature and pH on decolourization

<i>t</i> / °C	pH	<i>V</i> (30% <i>H</i> ₂ <i>O</i> ₂)/ mL	Time/h	Whiteness/ %	<i>t</i> / °C	pH	<i>V</i> (30% <i>H</i> ₂ <i>O</i> ₂)/ mL	Time/h	Whiteness/ %
25	5~6	150	12	10	65~70	8~9	150	5	35
25	8~9	150	12	13	18	10	150	18	9

度达到 35%。同时 pH 值也显著影响 H₂O₂ 对蚕蛹甲壳素的脱色效果。因 H₂O₂ 分解反应为:



故碱性条件能够促进 H₂O₂ 的分解, 提高原子氧的产生速度。因此, 宜在碱性条件下脱色蚕蛹甲壳素。

2.4 H₂O₂ 用量对蚕蛹甲壳素脱色的影响

将用 50 g 蚕蛹渣制得的脱 Ca²⁺ 甲壳素用 200 mL 纯净水分散后用 5% NaOH 溶液调节 pH=9.0, 于 65~70 °C 下分次加入 H₂O₂ (每次 5 mL), 直至脱色物颜色基本不变时停止, 结果见图 1。当 H₂O₂ 用量在 20~120 mL 区间时, 蚕蛹甲壳素的白度随 H₂O₂ 的增加而线性增加, 当 H₂O₂ 量超过 120 mL 后, 白度增加逐渐趋平。因此, H₂O₂ 的用量应为 $m(\text{蚕蛹渣})\dot{m}(30\%H_2O_2)=50\dot{1}30$ 。

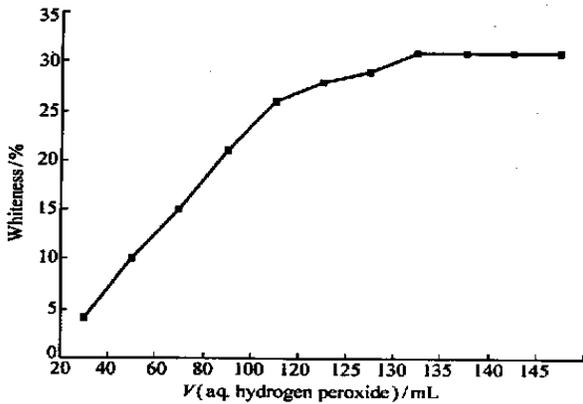


图 1 白度与 H₂O₂ 用量的关系

Fig. 1 Dependence of decolorization efficiency vs amount of aq. hydrogen peroxide

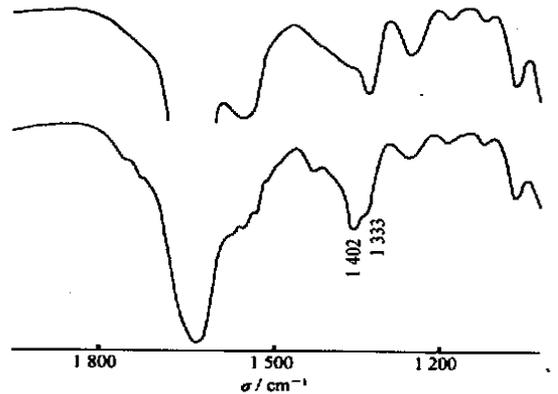


图 2 脱色前(下)后(上)红外光谱图

Fig. 2 Infrared spectra of crude chitin(lower line) and decolored chitin(upper line)

2.5 脱色机理探讨

X 射线荧光能谱仪分析结果(表 4)表明, 脱色前后的甲壳素中 Fe 元素的含量都很高; 粗甲壳素中含有较多的硫, 脱色甲壳素则不含硫。离子色谱分析(图 3)表明, 粗甲壳素的水溶液中无硫离子的色谱峰。所以有色物质可能与 Fe 和有机硫化物有关。

微生物和动植物组织中广泛存在着铁硫蛋白、细胞色素参与光合作用和呼吸作用等过程。铁硫蛋白类的分子中含有非卟啉铁^[6], 其活性部分含有 2 个活泼的 S 和 2 个 Fe 原子。铁硫蛋白中除含 Fe 和 S 外还含有 4 个半胱氨酸。

有机化合物的颜色来自共轭双键系统和非共用电子对的双键基团^[7]。在动物组织中, 甲壳素往往与蛋白质形成复合物, 而显色基团位于蛋白质上。红外光谱分析(图 2)表明, 粗甲壳素在 1402 cm⁻¹ 处出现 -CH₂-SH 的吸收峰^[8], 这个基团是半胱氨酸的一部分; 而脱色甲壳素却无此峰。H₂O₂ 可氧化蛋白质中含硫氨基酸成亚砷^[9], 所以 H₂O₂ 的脱色机

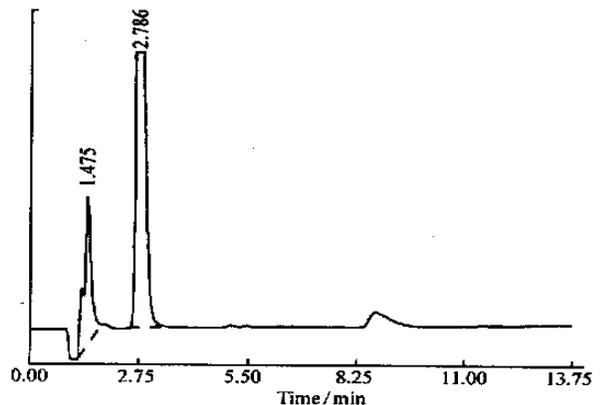


图 3 粗甲壳素的离子色谱图

Fig. 3 Ion chromatography of crude chitin

制可能是它产生的活性 O_2^\cdot 既破坏了铁硫蛋白或细胞色素复合物体系的共轭双键系统, 又将半胱氨酸氧化成半胱氨酸亚砷, 致使蛋白质从甲壳素上脱离下来, 从而使甲壳素脱色。壳聚糖与二价的铁螯合呈黄棕色, 与三价铁螯合呈黄绿色^[4]。这可能是 H_2O_2 脱色的蚕蛹甲壳素产物白度不高的一个重要原因。

表 4 蚕蛹甲壳素脱色前后的 X 射线荧光能谱仪分析结果

Table 4 ED-XRF spectra analysis of crude and decolored chitin

Sample	Si/%	S/%	Cl/%	K/%	Ca/%	Ti/%	Fe/%	Cu/%	Zn/%	Ga/%	Rb/%	Sr/%	Y/%	Zr/%
crude chitin	27.336	1.229	33.237	5.906	3.843	1.680	18.542	1.478	0.219	0.094	0.525	1.845	0.244	3.822
decolored chitin	26.908	0	33.980	6.683	3.919	1.566	21.375	0.098	0.149	0	0.966	1.402	0	3.822

参 考 文 献

- XIONG Yan-Fei(熊燕飞), CHEN Hua-Xin(陈怀新). *Nat Prod Res Develop* (天然产物研究与开发)[J], 1998, 11(1): 82
- ZHOU Xiao-Hua(周小华), TANG Zheng-Yan(汤正延). *Nat Prod Res Develop* (天然产物研究与开发)[J], 2002, 14(3): 30
- SHAO Jian-Hua(邵建华). *Jiangsu Chem Ind*(江苏化工)[J], 2002, 30(5): 6
- JIANG Ting-Da(蒋挺大). Chitosan(壳聚糖)[M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2001: 51, 80
- LIN Yuan-Ji(林元吉). Comprehensive Utilization for Silkworm Pod and Its Residual Product(桑蚕茧丝副产物的综合利用)[M]. Chengdu(成都): Sichuan Science and Technology Press(四川科学技术出版社), 1993: 1
- NIE Jian-Chu(聂剑初), WU Guo-Li(吴国利), ZHANG Yi-Shen(张翼伸). Compendious Tutorial of Biochemistry(生物化学简明教程)[M]. Beijing(北京): High Education Press(高等教育出版社), 1988: 158
- YU Zhong-Jian(余仲建), LI Song-Lan(李松兰), ZHANG Dian-Kun(张殿坤). Modern Organic Analysis(现代有机分析)[M]. Tianjin(天津): Tianjin Science and Technology Press(天津科学技术出版社), 1994: 4
- XIE Jing-Xi(谢晶曦), CHANG Jun-Biao(常俊标), WANG Xu-Ming(王绪明). Infrared Spectrum(红外光谱)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2001: 340
- Masiek D R, Menyong J T, Buges R R, *et al.* Strategies for Protein Purification and Characterization(蛋白质纯化与鉴定试验指南)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1999: 263

Decolorization of Chitin from Silkworm Chrysalis

LI Duan-Hua^{*}, ZHOU Xiao-Hua

(College of Chemistry and Chemical Engineering Chongqing University, Chongqing 400044)

Abstract The colored chitin has been isolated from silkworm chrysalis with protein being extracted off with NaOH solution. The decolorization of the colored silkworm chrysalis chitin was performed by aq. H_2O_2 solution treatment. The conditions for taking off protein are as follows: $m(5\%NaOH)/\dot{m}$ (silkworm chrysalis residue)=8030, $70^\circ C$ and 2 h. The calcium containing salts can be taken off completely with 3% HCl in conditions of 2 h, $25^\circ C$ and $m(3\%HCl)/\dot{m}$ (silkworm chrysalis residue)=83. The colored crude chitin without protein and salts can be decolored by H_2O_2 treatment in conditions of $65\sim 70^\circ C$, pH 8.5 \pm 0.5, 5 h and $m(30\%H_2O_2)/\dot{m}$ (silkworm chrysalis residue)=13050. The yield of white chitin is 25% with whiteness above 30%. It suggested that H_2O_2 oxidizes the sulfur of cysteine present in the system of iron-sulfur center and the cytochromes and changes it into sulfoxides, causing the chemical bond between the chromoprotein and the chitin to be broken and chromoprotein to be separated.

Keywords chitin, silkworm chrysalis, H_2O_2 , decolorization